

ENTWICKLUNG EINES
NIERENZELLKULTURMODELLS
ZUM STUDIUM
DER RENINFREISETZUNG

Angelika Regner-Hutter

*Diss. München
1983*



Aus dem Physiologischen Institut der Medizinischen
Fakultät der Universität Regensburg

Vorstand: Prof. Dr. C. Albers

Prof. Dr. Ch. Bauer

Prof. Dr. W. Moll

Prof. Dr. K. Schnell

vorgelegt über das

Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und
Ernährungsphysiologie der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. U. Lösch

ENTWICKLUNG EINES NIERENZELLKULTURMODELLS ZUM
STUDIUM DER RENINFREISETZUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Angelika Regner-Hutter
aus
Regensburg

München 1984

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. U. Lösch

Korreferent: Prof. Dr. A. Petter

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

1. INHALTSVERZEICHNIS

=====

1.1 Contents

2. EINLEITUNG

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkultur:

3.1.1 Isolierung der Nieren

3.1.2 Erzeugung einer Einzelzellsuspension

3.1.3 Zellkultur

3.2 Bestimmung der Reninaktivität:

3.2.1 Gewinnung von Reninsubstrat (Substrat-plasma)

3.2.2 Messung der Reninaktivität

3.2.3 Aufbereitung der Zellen und des Mediums

3.3 Immunhistochemie

4. ERGEBNISSE

4.1 Zellisolierung

4.2 Zellwachstum

4.3 Reninimmunfluoreszenz

4.4 Reniningehalt der Zellkulturen:

4.4.1 Mittlere zelluläre Reninaktivität

4.4.2 Absolute zellgebundene Reninaktivität

4.5 Reninsekretion in das Kulturmedium

4.6 Stimulation der Reninsekretion

5. DISKUSSION

5.1 Reninnachweis

5.2 Zellkultur

5.3 Reniningehalt der Zellkulturen

5.4 Reninsekretion

5.5 Stimulation der Reninsekretion

6. ZUSAMMENFASSUNG

6.1 Summary

7. LITERATURVERZEICHNIS

1.1 CONTENTS

=====

2. INTRODUCTION

3. MATERIAL AND METHODS

3.1 Cell culture:

3.1.1 Isolation of the kidneys

3.1.2 Preparation of a single cell suspension

3.1.3 Cell culture

3.2 Determination of the renin activity:

3.2.1 Preparation of the renin substrate

3.2.2 Measurement of the renin activity

3.2.3 Treatment of the cells and the culture
medium for the determination of the
renin activity

3.3 Immunohistochemistry

4. RESULTS

4.1 Isolation of the cells

4.2 Cellular growth

4.3 Reninimmunofluorescence

4.4 Renincontents of the cell cultures:

4.4.1 Mean cellular reninactivity

4.4.2 Absolute cellular renincontents

4.5 Renin release in the culture medium

4.6 Stimulation of the renin release

5. DISCUSSION

5.1 Renindetermination

5.2 Cell culture

5.3 Renincontents of the cell cultures

5.4 Renin release

5.5 Stimulation of the renin release

6. SUMMARY

7. REFERENCES

2. EINLEITUNG:

=====

Renin ist eine Protease, die aus dem α -Globulin Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I (A I) abspaltet. Hauptbildungsort von Renin ist die Niere, wo in den Epitheloidzellen der Vasa afferentia (Abb. 1) Renin synthetisiert, gespeichert und freigesetzt wird. Renin hat als regulierende Komponente des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAS) (Abb. 2) eine wichtige Funktion bei der Blutdruckregulierung. Ein Blutdruckabfall führt zur vermehrten Reninfreisetzung und diese zur vermehrten Angiotensin- und Aldosteronbildung. Angiotensin II führt akut zu einer Vasokonstriktion und damit zu einem Blutdruckanstieg, Aldosteron führt langfristig über eine vermehrte Na^+ -Rückresorption in der Niere zu einer Zunahme des Plasmavolumens. Außerdem wird dem Renin noch eine wichtige Aufgabe bei der Regulation der glomerulären Filtrationsrate zugeordnet (sog. tubuloglomerulärer Feed-back) (1). Untersuchungen über den Mechanismus der Reninsekretion wurden bislang an perfundierten Nieren, Nierengewebscheiben und isolierten Glomeruli durchgeführt.

Versuche an in situ perfundierten und an isoliert perfundierten Nieren ergaben, daß eine Erniedrigung des renalen Perfusionsdruckes und sympathoadrenerge Substanzen die Reninfrei-



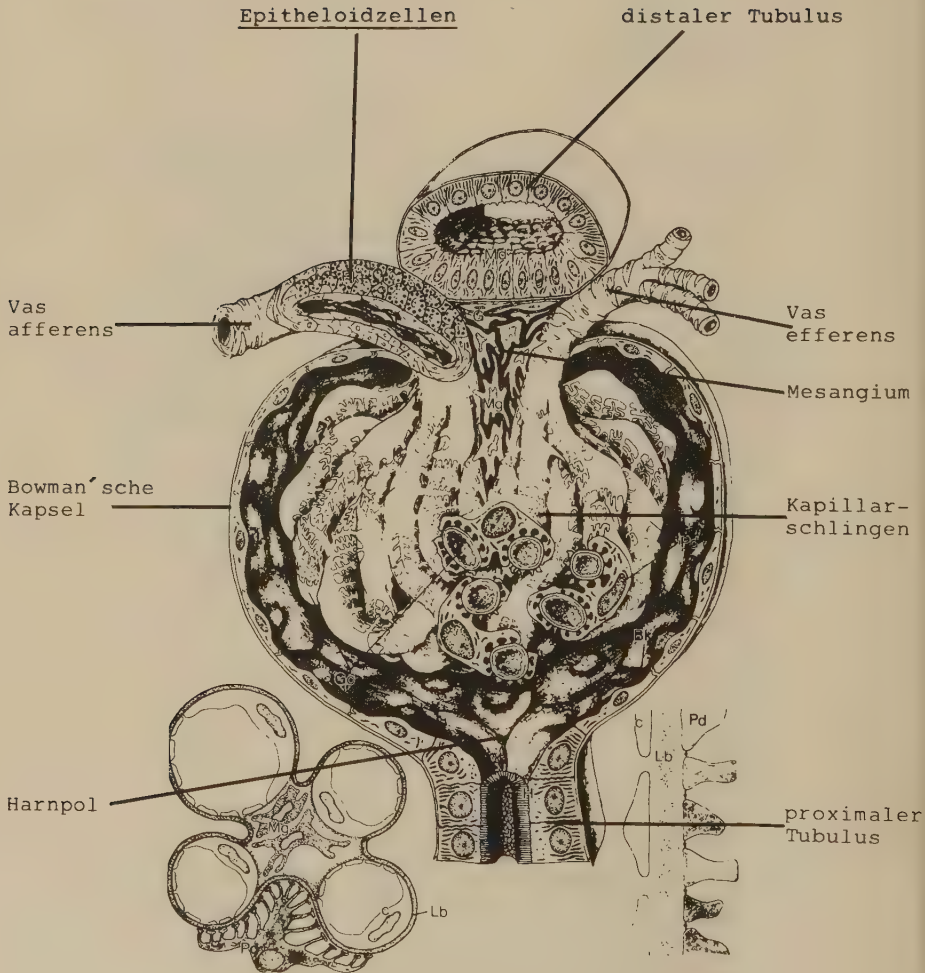


Abb. 1:

Schematische Darstellung eines Nierenglomerulus
 (aus Knoche H.: Lehrbuch der Histologie, Springer-
 Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1979, Seite
 273)

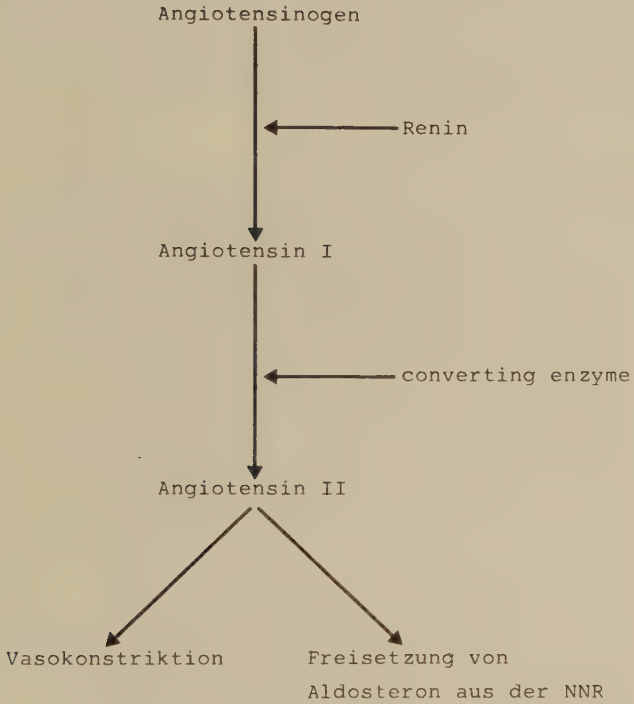


Abb. 2:

Schematische Darstellung des

Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAS)

setzung fördern (2, 3, 4). Außerdem wurde beobachtet, daß Prostaglandine die Reninfreisetzung beeinflussen (5, 6). Hemmung der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase durch Ouabain hemmt die Reninfreisetzung in perfundierten Nieren (7, 8, 9, 2).

Die Interpretation der mit sympathoadrenergen Substanzen und Prostaglandinen erhobenen Befunde bezüglich des Mechanismus der Reninsekretion ist schwierig, da bekannt ist, daß sympathoadrenerge Substanzen und Prostaglandine vasoaktiv sind und deshalb durch ihre Gefäßwirkung die Reninfreisetzung beeinflussen könnten.

Deshalb wurde, um die Rolle der Perfusion bei der Reninsekretion auszuschalten, die Reninsekretion in Nierengewebescheiben und in isolierten Nierenglomeruli untersucht. Versuche solcher Art zeigten, daß durch Zugabe des β -adrenergen Agonisten Isoproterenol die Reninfreisetzung um das 1,5- bis 3-fache gegenüber der Basalsekretion gesteigert werden kann. Die zur Stimulierung der Reninfreisetzung notwendigen Isoproterenol-Konzentrationen sind dabei allerdings abhängig vom verwendeten Versuchsobjekt. Während Isoproterenol im Konzentrationsbereich von 10^{-6} M - diese Konzentration stimuliert auch die Reninfreisetzung in perfundierten Nieren -

in Gewebescheiben die Reninsekretion bereits maximal stimuliert (10, 11, 12), sind zur Stimulation der Reninfreisetzung aus isolierten Glomeruli 100-fach höhere Isoproterenol-Konzentrationen notwendig (5, 13, 14, 15).

Die Rolle der Prostaglandine bei der Reninfreisetzung in Gewebescheiben und isolierten Glomeruli ist noch nicht klar. Es gibt Hinweise dafür, daß Prostaglandine in Nierenscheiben (11) nicht aber in Glomeruli (14) an der durch Isoproterenol stimulierten Reninfreisetzung beteiligt sind. Prostaglandin I_2 (Prostacyclin) und der Prostaglandinvorläufer Arachidonsäure fördern die Reninfreisetzung sowohl aus Nierenscheiben als auch aus Nierenglomeruli (16, 17, 18).

An den genannten in vitro Systemen konnte weiterhin bestätigt werden, daß Hemmung der $Na^+-K^+-ATPase$ durch Ouabain die Reninsekretion hemmt (19, 20, 21, 22, 23).

Auch Ionen beeinflussen die Reninsekretion. Calcium hemmt sowohl in Glomeruli als auch in Nierenscheiben die Reninsekretion (24, 22). Kalium in unphysiologisch niedrigen und

unphysiologisch hohen Konzentrationen hemmt ebenfalls die Reninfreisetzung (23). Die Wirkung des Kaliums wird dabei über die Beeinflussung der intrazellulären Calcium-Konzentration erklärt (25, 26, 27, 28, 29). Es gibt allerdings auch Mitteilungen, die von keiner Beeinflussung der Reninsekretion durch Ionen berichten (16). Es ist jedoch mit sämtlichen Versuchsmodellen bis heute noch nicht gelungen, den oder die Mechanismen der Reninfreisetzung lückenlos aufzuklären.

Das liegt zum einen daran, daß bei der Perfusion isolierter Nieren und bei der Verwendung von Gewebescheiben die Gefahr besteht, daß Gewebe nekrotisiert und damit zur länger-dauernden Untersuchung untauglich wird. Zum anderen ist zu beachten, daß die Zahl der reninhaltigen Zellen der Niere maximal nur etwa 1 ‰ der Gesamtzellmasse ausmacht, ein Umstand, der die Untersuchung des Zellstoffwechsels der Reninzellen an der Gesamtniere scheitern läßt.

Einen Ausweg aus diesen Schwierigkeiten bietet ein Versuchsmodell, welches reninhaltige Zellen in hohem Grade enthält und welches weiterhin die Integrität der Zellen während der Versuchs-

dauer gewährleistet. Diese Eigenschaften können entsprechend gewählte Zellkulturen besitzen. Erste Versuche, renale reninhaltige Zellkulturen zu etablieren, wurden von Khayat et al. (30) unternommen. Die Autoren berichteten, daß Explantate von Nierencortexstücken Renin in das Kulturmedium abgaben.

Vor kurzer Zeit gelang es Rightsel et al. (31), juxtaglomeruläre reninhaltige Zellen zu klonieren. Die Nachteile dieses Zellklones bestehen allerdings darin, daß die Züchtung der Zellen äußerst aufwendig ist und die Zellen Renin nur in einer Konzentration enthalten, die nur etwa ein Millionstel der Konzentration beträgt, die in Epitheloidzellen in situ zu finden ist. Eine Stimulierbarkeit der Reninfreisetzung durch Isoproterenol berichten diese Autoren nicht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, eine Methode zu entwickeln, die es erlaubt, reninhaltige Nierenzellkulturen mit hoher intrazellulärer Reninkonzentration auf möglichst einfache Weise zu erzeugen.

Es gelang, ausgehend von Ratten-Nierenrinden Zellkulturen zu etablieren, die zu 25 % reninhaltige Zellen enthielten. Der Reningehalt der Zellen war dabei 30.000-fach höher als der der

klonalen Zellen von Rightsel et al. (31). Die Reninfreisetzung in diesen Kulturen konnte mit Isoproterenol in physiologisch relevanten Konzentrationen (10^{-6} M) stimuliert werden. Das etablierte Zellkulturmodell erlaubt es, den Mechanismus der Reninsekretion auf einen bestimmten Reiz hin sowohl biochemisch als auch anatomisch zu verfolgen.

3. MATERIAL UND METHODEN:

=====

3.1 Zellkultur:

3.1.1 Isolierung der Nieren:

Zur Gewinnung der Nierencortexzellen wurden juvenile (80 - 120 g) männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Die Nieren wurden nach der Methode von Curthoys und Bellemann (32) isoliert. Die Tiere wurden mit Äther narkotisiert und die Bauchhöhle mit einem Medianschnitt eröffnet. Dann wurde die A. mesenterica cranialis und die Aorta cranial der Nieren ligiert, die Vena cava cranialis eröffnet und die Nieren wurden retrograd durch die Aorta perfundiert.

Die Perfusionslösung wurde nach Heidrich und Dew (33) folgendermaßen hergestellt: Hanks'-Salz-Lösung ergänzt mit 1 g Glucose, 17,11 g Saccharose, 2,2 g NaHCO_3 , 13 ml 200 mM 1-Glutamin-Lösung, 10 mg Rinderserumalbumin (BSA) und 0,84 g Na-Citrat x 2 H_2O auf 1.000 ml. Die Nieren wurden mit 50 ml Perfusionslösung pro Tier mit einer Perfusionsgeschwindigkeit von 10 ml/min. perfundiert. Nach der Perfusion wurden die Nieren steril exstirpiert und die Nierenkapsel wurde entfernt.

186

3.1.2 Erzeugung einer Einzelzellsuspension:

Das Nierenbecken und das Nierenmark wurden mit

einer Skalpellklinge entfernt und die Nierenrinde in ca. $1 \times 1 \times 1$ mm große Stücke geschnitten. Die Nierenrindenstücke wurden mit 50 ml der oben angeführten ergänzten Hanks'-Salz-Lösung (ohne Saccharose und ohne Na-Citrat), der 0,25 % Trypsin und 0,1 % Collagenase beigegeben war, 120 Minuten bei 37°C unter Begasung mit Luft und 5 % CO_2 inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension durch ein Nylonnetz mit einem Porendurchmesser von $22\text{ }\mu\text{m}$ gesiebt und dann 10 Minuten bei 1.500 U/min. zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde 3 x jeweils in 0,9 % NaCl resuspendiert und wieder 5 Minuten bei 1.500 U/min. zentrifugiert. Das schließlich resultierende Zellpellet wurde in einem kleinen Volumen 0,9 % NaCl gelöst und die Zellzahl mit einem Coulter counter (Beckman Electronics) bestimmt.

3.1.3 Zellkultur:

Die Zellsuspension wurde unter sterilen Bedingungen in 75 cm^2 -, 25 cm^2 -Falcon-Gewebskulturflaschen bzw. 7 cm^2 -Greiner-Gewebskulturschalen ausgesät und mit 10 ml, 5 ml bzw. 1 ml Kulturmedium bei 37°C bei 75 % N_2 , 20 % O_2 und 5 % CO_2 inkubiert. Als Kulturmedium wurde RMPI 1640 ergänzt mit 25 mM Hepes, 0,66 U/ml Insulin, 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin und 10 % foetalem Kälberserum verwendet. Die jewei-

lige Dichte der ausgesäten Zellen betrug zwischen 1×10^5 Zellen/cm² und 2×10^4 Zellen/cm². Das Kulturmedium wurde alle 2 - 3 Tage gewechselt. Die nach einigen Tagen auswachsenden Zellen wurden mit dem Phasenkontrastmikroskop photographisch festgehalten. Die Zellzahl wurde an den jeweiligen Kulturtagen durch Trypsinisierung (Zugabe von 1 ml 0,25 % Trypsin-Lösung mit 0,5 M EDTA) bestimmt. Nach Ablösen der Zellen von der Unterlage wurde das Trypsin durch Zugabe von Medium mit foetalem Kälberserum inaktiviert, die Zellsuspension mit Phosphat-gepufferter-Kochsalzlösung pH 7.4 (PBS) verdünnt und mit dem Coulter counter die Zellzahl bestimmt.

3.2 Bestimmung der Reninaktivität:

3.2.1 Gewinnung von Reninsubstrat (Substratplasma):

Zur Gewinnung des Reninsubstrats wurden adulte Ratten (200 - 250 g) beidseitig nephrektomiert. Die Tiere wurden hierzu mit Halothan narkotisiert und die Nieren von dorsal exstirpiert. Die nephrektomierten Ratten wurden 24 h bei freiem Zugang zu Futter und Wasser bei Zimmertemperatur gehalten. Nach 24 h wurden die Tiere mit Äther narkotisiert und durch Punktion der Bauchaorta entblutet. Das gewonnene Blut wurde nach sofortiger Zugabe von 10 mM EDTA 10 Minuten bei 6.000 U/min. zentrifugiert und das Plasma abgehoben. Das Plasma wurde

anschließend 24 h gegen 0,2 M Na-Maleat-Puffer, pH 6.0, mit 10 mM EDTA dialysiert. Dem dialysierten Plasma wurde dann 5 mM Phenylmethylsulfonylfluoride zugesetzt, um Angiotensinasen zu hemmen.

Die Angabe der Reninaktivität erfolgt als pro Zeiteinheit gebildetes Angiotensin I (ng A I/h).

3.2.2 Messung der Reninaktivität:

Die in den Zellen und im Medium vorhandene Reninaktivität wurde nach der Methode von Haber et al. (34) durch Messung des entstandenen Angiotensin I radioimmunologisch (Renk M, IDW, Dreieich) bestimmt. Bei der Bestimmung von Aktivität im Medium wurden 100 µl Medium, 100 µl Enzym-Inhibitorlösung (enthalten im Radioimmunoassay - RIA -) und 75 µl Substratplasma, bei der Messung von Aktivität in der Zellsuspension wurden 100 µl Zellsuspension mit 100 µl Substratplasma gemischt.

3.2.3 Aufbereitung der Zellen und des Mediums:

Die Zellen wurden 3 x mit 0,9 % NaCl mit 1 mM Phenylmethylsulfonylfluoride, 5 mM EDTA und 5 µg/ml Leupeptin (31) gespült, gefroren, abgekratzt und sofort eingefroren. Der Zellextrakt wurde zur Durchführung des Tests mit Ultraschall

(2 x 30 Sekunden bei 50 W mit dem Gerät Labsonic 1510, Braun Melsungen AG) behandelt, der Zell-extrakt mit dem Reninsubstrat gemischt und 1,5 h bzw. 3 h bei 37° C inkubiert. Der Zell-extrakt wurde im Verhältnis 1:10, 1:100 bzw. 1:1.000 verdünnt in den Test eingesetzt. Das Medium wurde 5 Minuten bei 8.000 U/min. zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge) und der Überstand abgehoben. Es wurde mit Reninsubstrat und Enzym-Inhibitorlösung versetzt und ebenfalls 1,5 h bzw. 3 h bei 37° C inkubiert und unverdünnt bzw. im Verhältnis 1:10 verdünnt in den Test eingesetzt.

3.3. Immunhistochemie:

Für den immunhistochemischen Nachweis von Renin wurden die Zellen auf Deckgläschen gezüchtet. Die Deckgläschen mit den Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und anschließend fixiert. Die Fixierlösung bestand aus 18,5 % Formaldehyd, gesättigter Pikrinsäure und 0,1 % Glutaraldehyd.

Den immunhistochemischen Reninnachweis mit einem spezifischen Renin-Antikörper führte Prof. Dr. R. Taugner, Heidelberg, durch.

Angaben der Daten:

Sämtliche Daten sind als Mittelwert $\pm$ S.E.M. angegeben. Die Ziffern in runden Klammern bezeichnen die Anzahl der Experimente.

4. ERGEBNISSE:

=====

Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden an insgesamt 17 voneinander unabhängigen Kulturreihen, die zwischen 7 und 30 Tage lang geführt wurden, gewonnen.

4.1 Zellisolierung:

Mit dem verwendeten Zelldissoziationsverfahren wurden bei juvenilen Ratten (Körpergewicht $108 \pm 5,3$ g) $1,2 \pm 0,01 \times 10^7$ Zellen ($n = 8$) erhalten.

Während der enzymatischen Dissoziation war die Zellausbeute zwischen der 30. Minute und der 120. Minute linear von der Inkubationszeit abhängig. Nach 120-minütiger Inkubation befand sich auf dem Sieb Rückstand, in dem unter dem Phasenkontrastmikroskop hauptsächlich Bindegewebsstränge sowie isolierte Tubuli und isolierte Glomeruli identifiziert werden konnten.

4.2 Zellwachstum:

Abbildung 3 zeigt die Abhängigkeit der Zelldichte im Kulturgefäß von der Kulturdauer am Beispiel von drei Kulturreihen. Die eingesetzte Zellmenge wurde dabei zwischen 5×10^4 Zellen/cm² und 1×10^5 Zellen/cm² variiert. Es ergab sich,

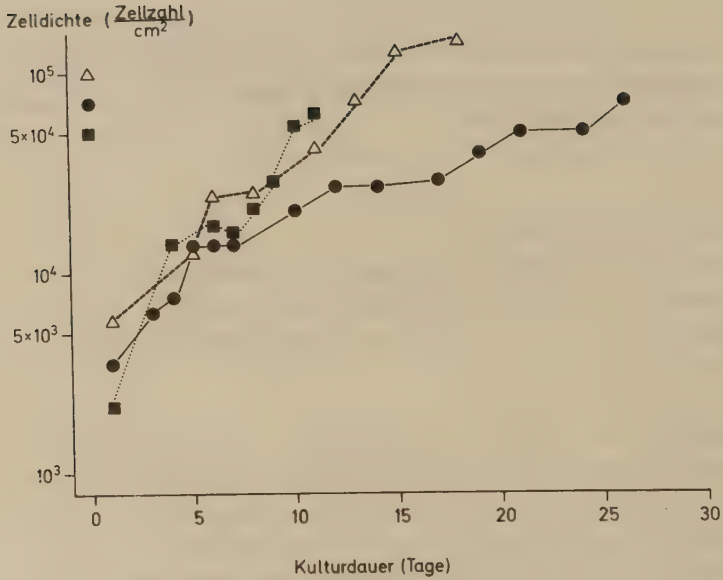


Abb. 3:

Abhängigkeit der Zelldichte von der Kulturdauer
am Beispiel von 3 Kulturen.

Die verschiedenen Symbole bezeichnen verschiedene
Kulturreihen.

daß etwa 5 % der eingesetzten Zellen am Kulturgefäß anhafteten. Die Verdopplungszeit der Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase lag im Mittel bei 3 Tagen. Die maximale Zelldichte, die in allen Versuchen zu beobachten war, lag bei $1,5 \times 10^5$ Zellen/cm².

Abbildung 4 a - c zeigt die Abhängigkeit des Zellbildes von der Kulturdauer. Während der ersten Kulturwoche bestimmten runde, einzeln liegende Zellen und Zellen mit klonalem, kontaktinhibiertem Wachstumsverhalten das Zellbild.

Ab der 2. Kulturwoche verschwanden diese Zellen zunehmend und fibroblastenähnliche, übereinander wachsende Zellen dominierten ab diesem Zeitpunkt. Die Zellen erinnerten in ihrem phasenkontrastmikroskopischen Aussehen an Mesangialzellen (35). Die Untersuchung einer Zellkultur auf den Gehalt an dem Intermediärfilament Desmin ergab, daß am 14. Kulturtag etwa 90 % der Zellen Desmin enthielten. Dies ist ein starker Hinweis darauf, daß es sich bei diesen Zellen um Mesangialzellen handelt (36, 37).

4.3 Reninimmunfluoreszenz:

Die Immunfluoreszenzuntersuchungen mit spezifischem Antikörper gegen Renin ergaben, daß

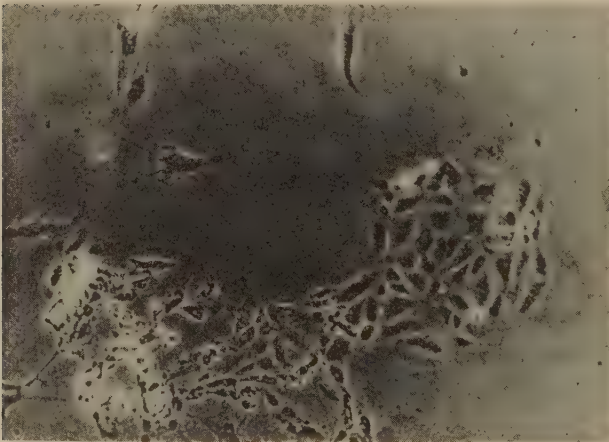
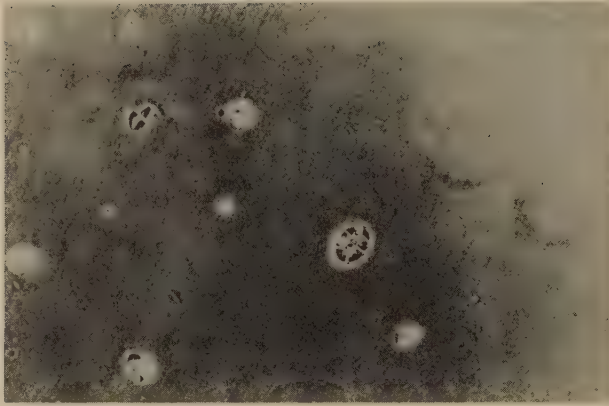


Abb. 4 a und 4 b:
Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Nieren-
rindenzellkulturen 2 Tage nach der Inkubation

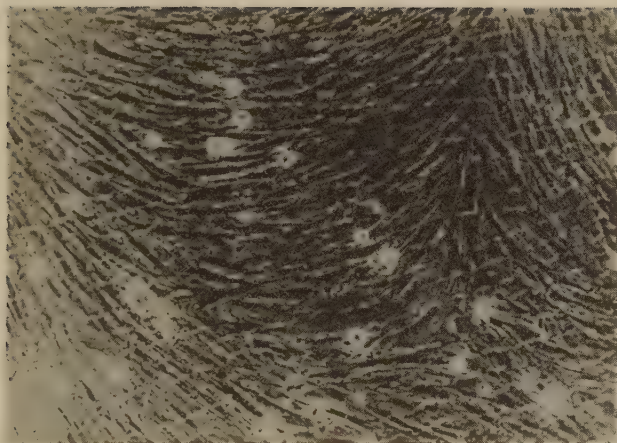


Abb. 4 c:

Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der Nieren-
rindenzellkulturen 14 Tage nach der Inkubation

während der ersten Kulturwoche nahezu alle Zellen Renin enthielten. Etwa 25 % der Zellen zeigten eine starke Immunfluoreszenz, was darauf hindeutet, daß diese Zellen in hoher Konzentration Renin enthielten.

4.4 Reningehalt der Zellkulturen:

4.4.1 Mittlere zelluläre Reninaktivität:

Die dissoziierten Zellen besaßen bei der Inkubation eine zelluläre Reninaktivität von $150 \pm 30 \frac{\text{ng A I}}{\text{h}} / 10^6$ Zellen ($n = 3$).

Abbildung 5 zeigt die Abhängigkeit der mittleren zellulären Reninaktivität von der Kulturdauer. Es ist ersichtlich, daß die Reninaktivität in der ersten Kulturwoche anstieg, zwischen dem 3. und 6. Kulturtag ein Maximum erreichte und dann exponentiell abfiel. In Subkulturen war kaum Reninaktivität nachweisbar.

4.4.2 Absolute zellgebundene Reninaktivität:

Aus Abbildung 6 ist die Abhängigkeit der zellgebundenen Reninaktivität pro Kulturgefäß von der Kulturdauer am Beispiel von 3 Kulturen zu entnehmen. Es ist ersichtlich, daß die absolute zelluläre Reninaktivität von der Inkubation an bereits exponentiell abnahm. Es wird weiterhin deutlich, daß die Reninaktivität täglich um

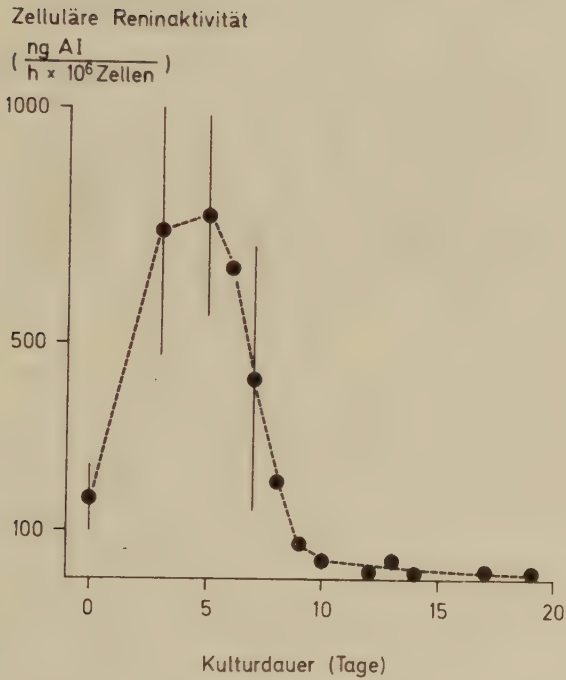


Abb. 5:

Abhängigkeit der mittleren zellulären Reninaktivität von der Kulturdauer.

Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ S.E.M. von vier verschiedenen Kulturreihen angegeben.

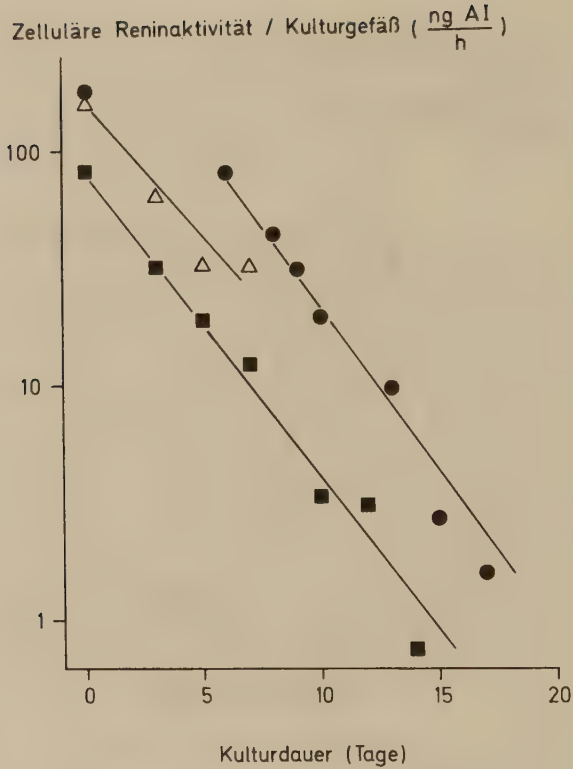


Abb. 6:

Abhängigkeit der absoluten in einem Kulturgefäß enthaltenen zellulären Reninaktivität von der Kulturdauer am Beispiel von drei Kulturen.
Verschiedene Symbole bezeichnen verschiedene Kulturen.

etwa 17 % der jeweiligen Reninaktivität abnahm.

4.5 Reninsekretion in das Kulturmedium:

Aus der Reninaktivität des Kulturmediums wurde aus 3 verschiedenen Kulturreihen die tägliche Reninsekretionsrate (Abb. 7) abhängig von der Kulturdauer berechnet. Es zeigte sich, daß die Reninsekretionsrate in der ersten Kulturwoche hoch war und dann stark abnahm.

Aus den Daten der Abbildungen 4 und 6 wurde versucht, den Anteil der zellgebundenen Reninaktivität zu bestimmen, der täglich in das Kulturmedium sezerniert wurde (Abb. 8). Es ist ersichtlich, daß dieser Anteil in den ersten beiden Kulturwochen zwischen 10 % und 20 % schwankte.

4.6 Stimulation der Reninsekretion:

Die Stimulation der Reninsekretion wurde am 5. Kulturtag mit der β -adrenergen Substanz Isoproterenol (10^{-6} M) durchgeführt.

Abbildung 9 a zeigt die Zeitabhängigkeit der Reninsekretion der Kontrolle, wobei altes Medium entfernt wurde und neues, auf 37° C vorgewärmtes Medium zugegeben wurde. Es wird deutlich, daß durch den Mediumwechsel in den ersten Minuten

die Reninsekretion stark anstieg, dann rasch abnahm und nach 60 Minuten etwa den Wert annahm, der sich aus Abbildung 6 als Basalwert errechnen läßt.

Abbildung 9 b zeigt die Zeitabhängigkeit der Reninsekretion in Gegenwart von 10^{-6} M Isoproterenol. Auch hier erfolgt in wenigen Minuten ein Anstieg der Reninsekretion, der allerdings über 30 Minuten anhält und dann zu Werten der Basalsekretion abnimmt.

Abbildung 9 c zeigt zur Verdeutlichung das Verhältnis der Reninsekretion unter Isoproterenol-Stimulation und der Kontrolle. Es ist ersichtlich, daß Isoproterenol zwischen der 15. und 30. Minute deutlich die Reninsekretion stimuliert.

Reninsekretion in das Medium
($\frac{\text{ng AI}}{\text{h}}$ / 10^6 Zellen und Tag)

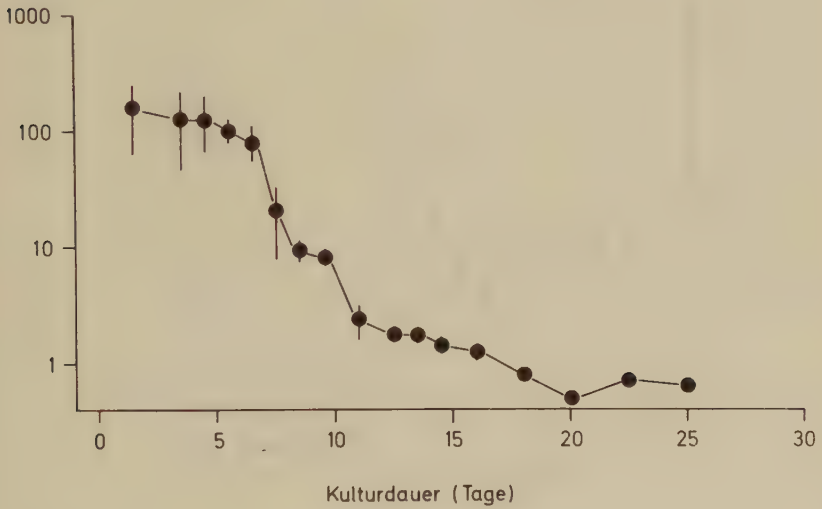


Abb. 7:

Abhängigkeit der täglichen Reninsekretion in das Medium von der Kulturdauer. Die Reninsekretion wurde durch Messung der Mediumreninaktivität bestimmt. Die Daten stammen aus vier verschiedenen Kulturreihen.

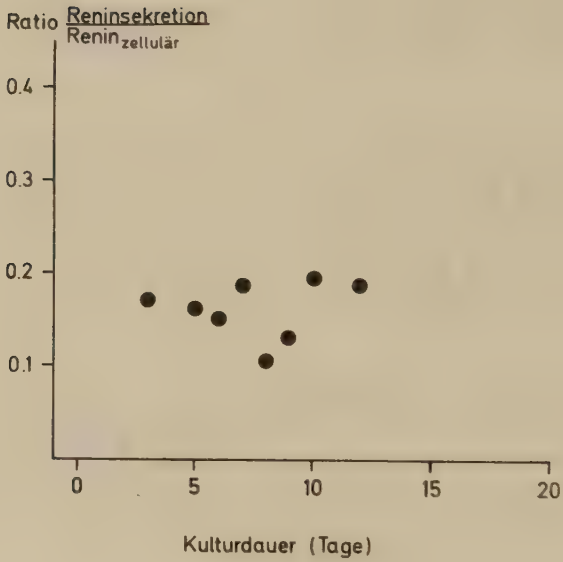


Abb. 8:

Zeitliche Abhängigkeit des Verhältnisses von Reninsekretionsrate zu zellgebundener Reninaktivität.

Zur Berechnung des Verhältnisses wurden die Daten aus Abbildung 5 und 7 verwendet.

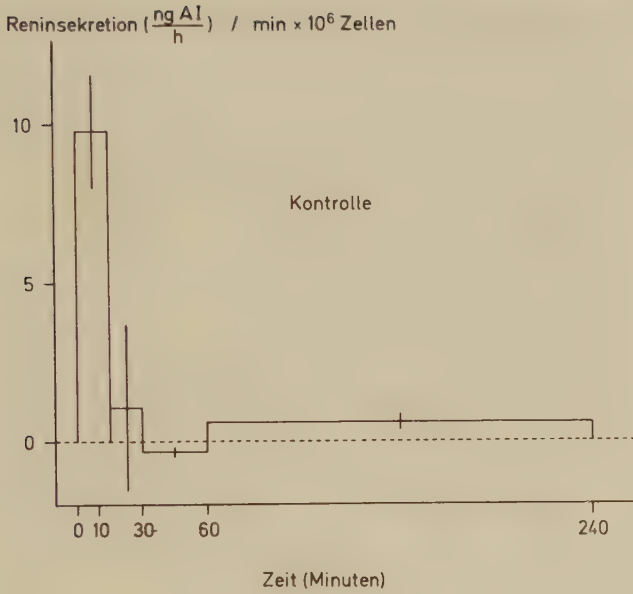


Abb. 9a:

Zeitliche Abhängigkeit der Reninsekretion nach Stimulierung.
Der Stimulus wurde zum Zeitpunkt 0 gesetzt.

a) Kontrollmedium

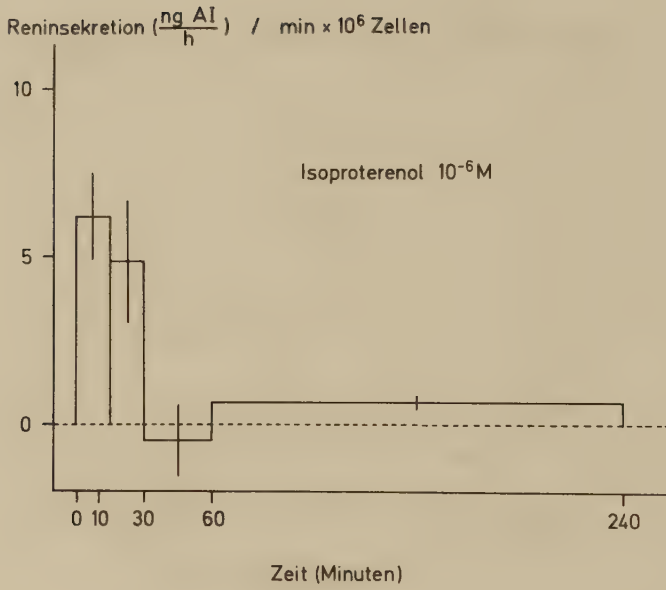


Abb. 9b:

Medium + 10^{-6} M Isoproterenol

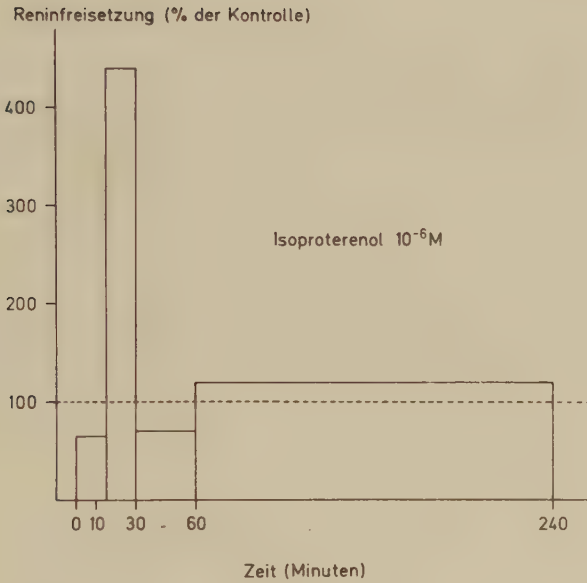


Abb. 9c:

Vergleich der Reninsekretionsrate von Kontrolle und Isoproterenolzugabe.

Die Reninsekretionsrate nach Isoproterenolzugabe wurde als Prozentwert der jeweiligen Sekretionsrate nach Zugabe des Kontrollmediums angegeben.

5. DISKUSSION:

=====

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, ein Nierenzellkulturmodell zu entwickeln, an dem die Reninsekretion studiert werden kann.

Unter Verwendung von steril präparierten Ratten-
nieren gelang es, durch eine Kombination bio-
chemischer, enzymatischer und mechanischer Disaggre-
gationsverfahren reproduzierbar Primärkulturen von
Nierenrindenzellen zu erzeugen, in denen deutlich
Renin nachgewiesen werden konnte.

5.1 Reninnachweis:

Der Reninnachweis basiert auf der Angiotensin-I-
Bildung aus dem Substrat Angiotensinogen (sog.
Reninsubstrat). Renin spaltet dabei eine Leucin-
Leucin-Bindung im Angiotensinogenmolekül. Diese
Leucin-Leucin-Bindung kann aber auch durch
Cathepsin D, eine unspezifische zelluläre saure
Protease, gespalten werden (38, 39). Es ist des-
halb notwendig zu klären, ob die von uns bestimm-
ten Reninaktivitäten auch tatsächlich auf Renin
zurückzuführen sind. Aus zwei Gründen folgern
wir, daß es sich bei der gemessenen Reninakti-
vität tatsächlich um Renin handelt.

Zum einen zeigten Immunfluoreszenzuntersuchungen mit spezifischen Reninantikörpern, daß 25 % der kultivierten Zellen eine starke Reaktion mit dem Reninantikörper aufwiesen. Die radioimmunologisch bestimmte zelluläre Reninaktivität korrelierte mit der Stärke der Immunfluoreszenz dieser Zellen.

Zum anderen wurden die Reninaktivitätsmessungen mit homologem Substrat bei pH 6.0 durchgeführt. Rightsel et al. (31) zeigten, daß bei pH 6.0 unter Verwendung von Rattenreninsubstrat die Reninaktivität von kultivierten Rattennierenzellen ausschließlich auf Renin zurückzuführen war.

5.2 Zellkultur:

Die angelegten Primärkulturen zeigten ein typisches Zellmuster. Während der ersten Kulturwoche dominierten einzeln liegende, runde Zellen und Zellen mit klonalem, kontaktinhibiertem Wachstum das Zellbild. Auf Grund des Wachstumsverhaltens dürfte es sich bei den letzteren Zellen um epitheliale Zellen handeln. Diese Zellen verschwanden zunehmend ab der 2. Kulturwoche und übereinander wachsende Zellen mit hohem Desmingehalt bestimmten ab dann das Zellbild. Bei diesen Zellen handelt

es sich mit größer Wahrscheinlichkeit um Mesangialzellen (36).

Die Reninimmunfluoreszenzuntersuchungen zeigten, daß während der ersten Kulturwoche nahezu alle Zellen Renin enthielten, 25 % davon allerdings in hoher Konzentration. Die Zellen, die Renin in hoher Konzentration enthielten, waren rund und zeigten keine Teilungsfiguren. Der Anteil dieser Zellen nahm während der Kulturdauer in dem Maße ab, wie die Gesamtzellzahl zunahm. Diese Beobachtung würde auch dafür sprechen, daß sich die Zellen in der Kultur nicht vermehrten. Es ist zu vermuten, daß es sich bei den Zellen, die Renin in hoher Konzentration enthielten, um Epitheloidzellen des Vas afferens handelt. Der geringe Renin-gehalt aller übrigen Zellen könnte auf eine unspezifische Eigensynthese von Renin (40) zurückzuführen sein. Eine andere Möglichkeit wäre, daß diese Zellen Renin aus dem Kulturmedium aufgenommen haben. Nimmt man an, daß es sich bei den epithelialen Zellen der ersten Kulturwoche wahrscheinlich um tubuläre Zellen handelt, so wäre diese zweite Möglichkeit auch einleuchtend, weil bekannt ist, daß Nierentubuluszellen in vivo zirkulierendes Renin aufnehmen und abbauen (41, 42).

5.3 Reningehalt der Zellkulturen:

Der mittlere zelluläre Reningehalt (bezogen auf 10^6 Zellen) der kultivierten Zellen zeigte einen typischen Zeitverlauf. Der Reningehalt stieg nach der Inkubation der Zellen an, erreichte während der ersten Kulturwoche ein Maximum und fiel dann exponentiell ab. Der maximale zelluläre Reningehalt war dabei etwa 30.000-fach höher als der der klonierten Zellen von Rightsel et al. (31). Da der absolute zelluläre Reningehalt eines einzelnen Kulturgefäßes von der Inkubation an bereits exponentiell abnahm, ist zu schließen, daß die Zunahme des mittleren zellulären Reningehaltes nach der Inkubation wahrscheinlich auf ein selektives Anhaften der Epitheloidzellen zurückzuführen ist.

5.4 Reninsekretion:

Die Zellen setzten Renin frei, da auch im Kulturmedium deutlich Reninaktivität nachzuweisen war. Die Reninsekretionsrate zeigte dabei einen Zeitverlauf, der dem des zellulären Reningehaltes entsprach. Aus Berechnungen ergab sich, daß die tägliche Reninsekretion proportional dem zellulären Reningehalt war, wobei täglich zwischen 10 und 20 % des zellulären Renins in das Medium

abgegeben wurde. Das bedeutet, daß die Zellen stündlich zwischen 0,4 und 0,8 % ihres Reningehaltes entließen. Diese Sekretionsrate ist typisch für die reninhaltigen Zellen in der Gesamtniere (43, 44, 45, 46). Für isolierte Glomeruli und Gewebescheiben wurden Reninsekretionsraten als typisch beschrieben, die etwa 20-fach höher sind (47, 48, 9). Das würde bedeuten, daß die kultivierten Zellen in ihrer Reninsekretion den reninhaltigen Zellen in der Niere gut vergleichbar sind. Weitere Kalkulationen ergaben, daß die Reninsekretion in das Medium quantitativ der Abnahme des zellulären Renins entsprach. Das bedeutet, daß die Zellen während der Kulturzeit ihre Reninvorräte entspeicherten und keine Netto-Neusynthese von Renin erfolgte. Die Befunde der Reninsekretion stimmen gut mit den Ergebnissen von Rightsel et al. (31) überein, welche fanden, daß die klonalen Epitheloidzellen etwa 30 % des zellulären Gehaltes in das Medium entließen. Die Reninsekretion scheint ein Spezifikum der reninhaltigen Zellen der Niere zu sein. Denn auch in anderen Zellkulturen wie beispielsweise Neuroblastomzellen (49) wurde zum Teil hohe zelluläre Reninkonzentration beschrieben. Diese Zellen entließen aber kein Renin in das Kulturmedium. Warum die Reninfreisetzung unserer Zellkulturen nicht von einer Netto-Neusynthese begleitet wurde, kann hier nicht beantwortet werden.

Die beobachtete Entspeicherung der reninhaltigen Zellen könnte allerdings die Erklärung für den niedrigen Reningehalt der klonalen Epitheloidzellen von Rightsel et al. (31) sein.

5.5 Stimulation der Reninsekretion:

Untersuchungen zur Stimulierbarkeit der Reninsekretion wurden am 5. Kulturtag durchgeführt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, weil hierbei der zelluläre Reningehalt hoch ist. Es stellte sich heraus, daß der Austausch des Kulturmediums bereits eine Stimulation der Reninsekretion bewirkte. Diese Stimulation der Reninsekretion machte etwa das 20-fache der Basalsekretion aus und war nur unmittelbar nach dem Austausch des Kulturmediums zu beobachten. Zugabe von Kulturmedium, das Isoproterenol (10^{-6} M) enthielt, bewirkte eine Stimulation der Reninsekretion über 30 Minuten. Im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 9c) war zwischen der 15. und 30. Minute eine erhöhte Reninsekretion zu beobachten, woraus zu schließen ist, daß Isoproterenol die Reninfreisetzung in den Kulturen stimulierte.

Es muß jedoch noch geklärt werden, warum der Austausch des Kulturmediums bereits ein starker Reiz für die Reninfreisetzung ist, da dieses Phänomen

zelluläre biochemische Untersuchungen zur
Reninfreisetzung auf einen Reiz hin erschwert.

6. ZUSAMMENFASSUNG:

=====

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, ein Zellkultursystem zu entwickeln, das es erlaubt, den Mechanismus der Reninsekretion zu studieren. Aus diesem Grunde untersuchten wir den Reningehalt und die Reninfreisetzung von Primärkulturen von Zellen, die aus der Nierenrinde von Ratten gewonnen wurden. Die Isolation der Zellen wurde mit einer Kombination einfach durchzuführender Verfahren wie Perfusion mit Chelatbildnern, Inkubation mit Trypsin und Collagenase und mechanischer Disaggregation durchgeführt.

Durch die Anwendung dieser Methoden wurden Primärkulturen gewonnen, die ca. 25 % Zellen mit hohem Reningehalt enthielten. Diese Zellen mit hohem Reningehalt proliferierten unter Zellkulturbedingungen nicht. Die Zellen entließen ihren Reningehalt in das Kulturmedium während einer Kulturperiode von 3 Wochen.

Die Reninfreisetzung dieser Zellen konnte durch den β -adrenergen Agonisten Isoproterenol (10^{-6} M) stimuliert werden.

Unsere Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß Primärkulturen von Zellen der Nierenrinde als nützliches

Modell für das Studium des Mechanismus der
Reninfreisetzung dienen können.

6.1 SUMMARY:

=====

Development of a model of renal cell cultures for studying the renin secretion

The aim of the present investigation was to develop a cell culture system that allows to study the mechanism of renin secretion. To this end we determined the renin content and the renin release of primary cultures of cells isolated from rat renal cortex. Cell isolation was achieved by the combination of procedures that are routinely used. These comprise perfusion of the kidney with chelating agents, incubation with trypsin and collagenase and mechanical disintegration.

Application of these methods yields in primary cultures that contained about 25 % cells with high renin content. These cells did not proliferate under the present cell culture conditions. They released their renin content into the culture medium during a culture period of 3 weeks.

The secretion of renin by these cells could be stimulated by the β -adrenergic agonist isoproterenol (10^{-6} M).

Our results suggest that primary cultures of renal cortical cells might serve as an useful tool for studying the mechanism of renin secretion.

7. LITERATURVERZEICHNIS:

=====

1. Thureau K., Grüner A., Mason J., Dahlheim H.:
Tubular signal for the renin activity in the
juxtaglomerular apparatus.
Kidney Int. 22, Suppl. 12, 55, (1982)
2. Fray J. C. S.:
Mechanism by which secretion from perfused rat
kidneys is stimulated by isoprenaline and in-
hibited by high perfusion pressure.
J. Physiol. 308, 1, (1980)
3. Blair M. L.:
Stimulation of renin secretion by α -adrenoceptor
agonists.
Am. J. Physiol. 244, E 37, (1983)
4. Johnson M. D., Shier D. N., Barger A. C.:
Circulating catecholamines and control of plasma
renin activity in conscious dogs.
Am. J. Physiol. 236, H 463, (1979)
5. Beierwaltes W. H., Schryver S., Sanders E.,
Strand J., Romero J. C.:
Renin release selectively stimulated by prosta-
glandin I₂ in isolated rat glomeruli.
Am. J. Physiol. 243, F 276, (1982)

6. Weber P. C., Larsson C., Änggård E., Hamberg M.,
Corey E. J., Nicolaou K. C., Samuelsson B.:
Stimulation of renin release from rabbit renal
cortex by arachidonic acid and prostaglandin
endoperoxides.
Circ. Res. 39, 868, (1976)
7. Churchill P. C., Mc Donald F. D.:
Effect of ouabain on renin secretion in
anaesthetized dogs.
J. Physiol. 242, 635, (1974)
8. Blaine E. H., Zimmerman M. B.:
Renal function and renin secretion after
administration of ouabain and ouabain plus
furosemide in conscious sheep.
Circ. Res. 43, 36, (1978)
9. Cruz-Soto M. A., Benable J. E., Lopez-Novoa J. M.,
Martinez-Maldonado M.:
Renal $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in renin release.
Am. J. Physiol. 243, F 598, (1982)
10. Churchill P. C., Churchill M. C., Mc Donald F. D.:
Evidence that β_1 -adrenoceptor activation mediates
Isoproterenol-stimulated renin secretion in the
rat.
Endocrinol. 113, 687, (1983)

11. Suzuki S., Franko-Saenz R., Murlow P. J.:
The role of renal prostaglandins in the renin response to Isoproterenol in the rat in vitro.
Endocrinol. 108, 1654, (1981)
12. Katz S. A., Malvin R. L.:
Independence of β -adrenergic stimulation of renin release on renin synthesis.
Am. J. Physiol. 243, F 434, (1982)
13. Porter J. P., Said S. J., Ganong W. F.:
Vasoactive intestinal peptide stimulates renin secretion in vitro: evidence for a direct action of the peptide on the renal juxtaglomerular cells.
Neuroendocrinol. 36, 404, (1983)
14. Beierwaltes W. H., Schryver S., Olson P. S., Romero J. C.:
Interaction of the prostaglandin and renin-angiotensin systems in isolated rat glomeruli.
Am. J. Physiol. 239, F 602, (1980)
15. Morris B. J., Nixon R. L., Johnston C. J.:
Release of renin from glomeruli isolated from rat kidney.
Clin. exp. Pharmacol. Physiol. 3, 37, (1976)

16. Aoi W., Wade B., Rosner D. R., Weinberger H.:
Renin release by rat kidney slices in vitro:
effects of cations and catecholamines.
Am. J. Physiol. 227, 630, (1974)
17. Beierwaltes W. H., Schryver S., Olson P. S.,
Romero J. C.:
Control of renin release in isolated rat
glomeruli.
Hypertension 3, Suppl. II, 30, (1981)
18. Whorton A. R., Misoni K., Hollifield J.,
Frölich J. C., Inagami T., Oates J. A.:
Prostaglandins and renin release: Stimulation
of renin release from rabbit renal cortical
slices by PGI_2 .
Prostaglandins 14, 1095, (1977)
19. Churchill P. C.:
Possible mechanism of the inhibitory effect
of ouabain on renin secretion from rat renal
cortical slices.
J. Physiol. 294, 123, (1979)
20. Churchill P. C., Mc Donald F. D., Churchill M. C.:
Phenytoin stimulates renin secretion from rat
kidney slices.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 211, 615 (1979)

21. Lyons H. J.:

Studies on the mechanism of renin release from rat kidney slices: calcium, sodium and metabolic inhibition.

J. Physiol. 304, 99, (1980)

22. Park Ch. S., Han D. S., Fray J. C. S.:

Calcium in the control of renin secretion: Ca^{2+} influx as an inhibitory signal.

Am. J. Physiol. 240, F 70, (1981)

23. Churchill M. C., Churchill P. C., Mc Donald F. D.:

Comparison of the effects of rubidium and potassium on renin secretion from rat kidney slices.

Endocrinol. 112, 777, (1983)

24. Baumbach L., Skott O.:

Isolated glomeruli in vitro: an approach to the macula-densa-mediated renin release. Kidney Int. 22, Suppl. 12, 73, (1982)

25. Park C. S., Malvin R. L.:

Calcium in the control of renin release.

Am. J. Physiol. 235, F 22 (1978)

26. Churchill P. C.:

Effect of D-600 on inhibition of in vivo renin release in the rat by high extracellular potassium and angiotensin II.

J. Physiol. 304, 449, (1980)

27. Churchill M. C.:

Calcium dependency of the inhibitory effect of antidiuretic hormone on in vitro renin secretion in rats.

J. Physiol. 315, 21, (1981)

28. Churchill M. C., Churchill P. C.:

Separate and combined effects of ouabain and extracellular potassium on renin secretion from rat renal cortical slices.

J. Physiol. 300, 105, (1980)

29. Churchill P. C., Churchill M. C.:

Inhibition of in vitro renin release by low extracellular K.

Life Sci. 25, 687, (1979)

30. Khayat A., Lewis L. J., Smeby R. R.:

Renin release from cultured cells (Abstr.).

Fed. Proc. 37, 290, (1978)

31. Rightsel W. A., Okamura T., Inagami T.,
Pitcock J. A., Takii Y., Brooks B., Brown P.,
Murihead E. E.:
Juxtaglomerular cells grown as monolayer cell
culture contain renin, angiotensin-I-converting
enzyme, and angiotensin I and II/III.
Circ. Res. 50, 822, (1982)
32. Curthoys N. P., Bellemann P.:
Renal cortical cells in primary monolayer
culture.
Exp. Cell Res. 121, 31, (1979)
33. Heidrich H.-G., Dew M. E.:
Homogeneous cell populations from rabbit renal
cortex.
J. Cell Biol. 74, 780, (1977)
34. Haber E., Koerner T., Page L. B., Kliman B.,
Purdnode A.:
Application of radioimmunoassay for angiotensin
I to physiologic measurements of plasma renin
activity in normal human subjects.
J. Clin. Endocrinol. 29, 1349, (1969)
35. Kurtz A., Jelkmann W., Bauer Ch.:
Mesangial cells derived from rat glomeruli produce
an erythropoiesis stimulating factor in cell culture.
Febs Lett. 137, Nr. 1, 129, (1982)

36. Kurtz A., Jelkmann W., Sinowatz F., Bauer Ch.:
Renal mesangial cell cultures as a model for
study of erythropoietin production.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80, 4008, (1983)
37. Bachmann S., Kriz W., Kuhn C., Franke W. W.:
Differentiation of cell types in the mammalian
kidney by immunofluorescence microscopy using
antibodies to intermediate filament proteins
and desmoplakins.
Histochemistry 77, 365, (1983)
38. Day R. P., Reid J. A.:
Renin activity in dog brain: enzymological
similarity to cathepsin D.
Endocrinol. 99, 93, (1976)
39. Hackenthal E., Hackenthal R., Hilgenfeldt U.:
Purification and partial characterization of
rat brain acid proteinase (isorenin).
Biochim. Biophys. Acta 522, 561, (1978)
40. Schelling P., Ganten D., Speck G., Fischer H.:
Effects of angiotensin II and angiotensin II
antagonist saralasin on cell growth and renin
in 3T3 and SV3T3 cells.
J. Cell. Physiol. 98, 503, (1979)

41. Iwao H., Nakamura N., Ikemoto F., Yamamoto K.:
Whole body autoradiographic distribution of
exogenously administered renin in mice.
J. Histochem. Cytochem. 31, 776, (1983)
42. Bailie M. D., Donoso V. S., Porter T. M.:
Urinary excretion of renin in the dog: effect
of changes in plasma renin.
J. Exptl. Ther. 225, 336, (1983)
43. Schölkens B. A.:
Plasmarenin activity and vasodepressor action
of prostacyclin in anaesthetized rats.
Prostaglandins and Medicine 4, 357, (1980)
44. Franco-Saenz R., Suzuki S., Tan S. Y.:
Prostaglandins and renin production: a review
Prostaglandins 20, 1131, (1980)
45. Hashimoto T.:
Effects of prostaglandin E₂, I₂ and F_{2α} on
systemic and renal hemodynamics, renal function
and renin secretion in anaesthetized dogs.
Japan. J. Pharmacol. 30, 173, (1980)

46. Blair M. L.:
Inhibition of renin secretion by intrarenal
 α -adrenoceptor blockade.
Am. J. Physiol. 240, E 682, (1981)
47. Blendstrup K., Leyssac P. P.; Poulsen K.,
Skinner S. L.:
Characteristics of renin release from isolated
superfused glomeruli in vitro.
J. Physiol. 246, 653, (1975)
48. Corsini W. A., Crossland K. L., Bailie M. D.:
Renin secretion by rat kidney slices in vitro.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145, 403, (1974)
49. Okamura T., Clemens D. L., Inagami T.:
Renin, angiotensins, and angiotensin-converting
enzyme in neuroblastoma cells: evidence for
intracellular formation of angiotensins.
J. Cell. Biol. 78, 6940, (1981)

D A N K S A G U N G

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ch. Bauer für die Anregung zu dieser Arbeit und für die jederzeit gewährte wohlwollende Unterstützung bei deren Durchführung. Ganz herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. A. Kurtz für die stetige großzügige Hilfe und für die anregenden Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. R. Taugner, Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg, danke ich für die Durchführung des immunhistochemischen Reninnnachweises.

Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. U. Lösch für die Durchsicht der Arbeit und für die wohlwollende Beratung.

Außerdem bedanke ich mich bei Fr. Rita Ludwig und Fr. Luise Rauch für die technische Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

geboren am: 24.9.1952 in Regensburg
Eltern: Josef Regner, Schreinermeister, und
dessen Ehefrau Anna, geb. Witzmann
Familienstand: verheiratet

Ausbildungsdaten:

Schul Ausbildung: 1958 - 1964 Volksschule in Regensburg
1964 - 1968 Realschule in Regensburg
Abschluß: mittlere Reife
1973 - 1977 Abendgymnasium in Regensburg
Abschluß: Abitur
Studium: 1977 - 1982 Studium der Tiermedizin an
der Universität in München
Dezember 1982 Abschluß des Staatsexamens
Februar 1983 Approbation als Tierarzt
Dezember 1982 Beginn der Untersuchungen
zur vorliegenden Arbeit

Berufstätigkeit:

1968 - 1974 Verw.-Angestellte beim
Sozialgericht Regensburg
1974 - 1976 Verw.-Angestellte beim
Arbeitsamt Regensburg

